

Inmunidad pasiva en potros de madres inmunoestimuladas con células inactivadas de *propionibacterium granulosum* y lipopolisacáridos (Lps)

Camilo A. Becerra Sandoval*, Diego H. Montenegro Castillo**, Germán F. Ramírez***, Mauricio Parada Gómez****, Francisco Bustos Malavet***** , Jorge Almansa Manrique*****

Fecha de recepción: abril 15 de 2008
Fecha de aprobación: septiembre 10 de 2008

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto del uso de un producto inmunomodulador, preparado con Lipopolisacárido de *E. Coli* y células inactivadas de *Propionibacterium granulosum*, y aplicado a yeguas en la última fase de la gestación. Se evaluó en los potros las concentraciones de IgG e IgM después del consumo de calostro y se determinaron los parámetros de morbimortalidad neonatal y pesos al nacimiento y al destete. Se obtuvo un efecto positivo general con el uso del producto bajo las condiciones en las que se realizó el estudio.

Palabras clave: inmunidad pasiva natural, inmunomodulación, LPS, *Propionibacterium granulosum*.

PASSIVE IMMUNITY IN COLTS FROM IMMUNOSTIMULATED MARES WITH INACTIVATED CELLS OF *PROPIONIBACTERIUM GRANULOSUM* AND LIPOPOLYSACARIDS (LPS).

ABSTRACT

The present study was carried out in order to evaluate the immunomodulator effect of *E.coli* lipopolisaccharide and inactivated cells of *Propionibacterium granulosum* applied in mares in the last stage of gestation. Serum IgG and IgM concentration was evaluated in colts after calostrum consume. Morbidity, mortality and weighs at day old and post weaning were evaluated. Positive effect of the product was observed under the condition of this study.

Keywords: immuno-modulating, *Propionibacterium granulosum*, Inmunocel

* Médico veterinario Universidad de La Salle. Correo electrónico: bcrra77@hotmail.com

** Médico veterinario Universidad de La Salle. Correo electrónico: diegovet81@yahoo.es

*** Médico veterinario. MSc. Docente área de reproducción, Universidad de La Salle. Correo electrónico: gramirezvet@hotmail.com

**** Médico veterinario, Universidad de La Salle. Gerente Comercial Laboratorios Calier. Correo electrónico: Mauricio-parada@calierandes.com

***** Médico veterinario y zootecnista. Universidad Nacional de Colombia, MS, Mvs. Docente Universidad de La Salle y Universidad Antonio Nariño. Correo electrónico: franciscobustos@hotmail.com

***** Médico veterinario Esp. MSc. Docente Universidad Antonio Nariño. Correo electrónico: jorge.almansa@uan.edu.co

INTRODUCCIÓN

La inmunidad pasiva natural es aquella que la madre transfiere al feto y al recién nacido con el objeto de protegerlo mientras él desarrolla suficientemente su sistema inmunológico y genera respuestas inmunes propias. Dentro de este proceso, la transferencia de anticuerpos o inmunoglobulinas cobra especial relevancia, pues los anticuerpos contra una serie de agentes para los cuales la madre ha generado una respuesta se transfieren al hijo.

En el caso particular de los equinos, la placenta resulta impermeable al paso de anticuerpos; en consecuencia, los potros nacen agammaglobulinémicos y dependen de la toma de calostro para su supervivencia en esa primera etapa de la vida. Las fallas que se presentan en la transferencia pasiva de anticuerpos, además de afectar distintos niveles del proceso, como la producción del calostro, la toma por parte del potro recién nacido y la absorción de inmunoglobulinas, son señaladas como las responsables de la morbilidad neonatal, que en las distintas especies y en diferentes sistemas de producción acredita las mayores pérdidas de todo el período de producción.

Si bien el manejo apropiado del período perinatal logra reducir los elevados índices de pérdida durante esa fase, recientemente la estimulación del sistema inmunológico en el período preparto se ha mostrado como una herramienta útil en ese propósito en especies como la porcina y la bovina (Benavides, A. *et ál.* 2006 y Patiño, J.D. y Gutiérrez, H.A., 2004). La aplicación del inmunomodulador durante la última fase de la gestación en las madres

porcinas y bovinas incrementó los niveles de inmunoglobulinas en las crías, redujo de manera importante la morbilidad e influyó positivamente en los pesos al destete de las crías.

El presente trabajo tuvo como propósito determinar el impacto del uso de LPS de *E. Coli* junto con *Propionibacterium granulosum* en yeguas durante la última fase de la gestación, sobre el nivel de gammaglobulinas del potro, su peso y los índices de morbilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en el municipio Pereira, capital del departamento de Risaralda, localizado a 4 grados 49 minutos de latitud norte, 75 grados 42 minutos de longitud y 1.411 metros sobre el nivel del mar, en el centro de la región occidental del territorio Colombiano.

El muestreo se llevó a cabo en el Criadero de las Américas, que tiene una extensión de 90 hectáreas, cuenta con una población de 110 animales y se encuentra ubicado en la vereda Alegrías de dicho municipio. El criadero, que cuenta con un adecuado manejo nutricional, servicio veterinario y un manejo reproductivo y genético, está diseñado para la crianza de caballos criollos colombianos y ha sido catalogado como uno de los mejores del llamado Eje Cafetero.

Para el trabajo se realizó un muestreo pareado que dio como resultado la selección al azar de dos grupos de yeguas; cada grupo estuvo integrado por 15 animales que presentaban 330 días de gestación y cuya edad oscilaba entre 6 y 9 años.

A los animales de la muestra se les suministró pasto de corte imperial 70 a voluntad, 6 kilos de concentrado por día suministrados en tres raciones, marca "Solla campeonas" y sal a voluntad. Las hembras permanecieron durante la última fase de la gestación en pesebrera. Cuando los animales del grupo experimental alcanzaron los 330 días de gestación, se les aplicaron 5 ml del producto inmunomodulador por vía intramuscular profunda y a los potros recién nacidos se les aplicaron 2 ml del biológico, igualmente por vía intramuscular. A las 36 horas postparto, a los potros se les tomó una muestra de sangre en tubos *Vacutainer* sin anticoagulante. Los sueros fueron trasladados al laboratorio para extraer el coágulo y se centrifugaron para limpiarlos de células. Las muestras se congelaron a -20° C hasta cuando fueron procesadas en el Laboratorio Clínico UNISAF, de la Universidad de La Salle. Para la valoración del tenor de inmunoglobulinas, se empleó el método inmuno difusión radial cuantitativa (RID) y la prueba de turbidez con sulfato de zinc. Adicionalmente, se registraron los pesos al nacimiento y al destete, así como las tasas de morbilidad y mortalidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número total de animales muestreados fue de 60, distribuidos en dos grupos de 15 yeguas con sus respectivos potros. Se determinaron las concentraciones de la Inmunoglobulinas (Ig) M y G, cuyas sumatorias fueron los siguientes:

IgG yeguas grupo control: 20 G/L

IgG yeguas grupo experimental: 23.3 G/L.

Xe: grupo experimental

Xc: grupo control

La diferencia, expresada en porcentaje, entre los dos grupos es la siguiente:

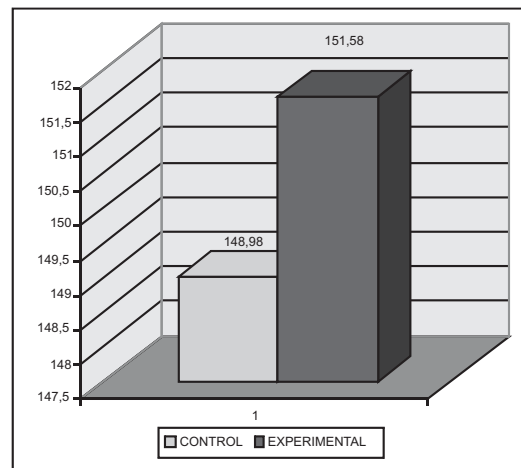
$$\frac{Xe - Xc}{Xe} \times 100:$$

$$\frac{23,3 - 20}{23,3} \times 100: 14,16\%$$

La diferencia de promedios entre el grupo control y el grupo experimental fue de $1,33 \pm 0,11$ y $1,55 \pm 0,14$, respectivamente.

Al realizar la prueba t con los anteriores datos, el resultado del nivel de significancia fue de $P \leq 0,000036$, lo que demuestra que la diferencia de niveles de IgG entre los grupos de yeguas es altamente significativo, pues se encuentra muy lejos del punto crítico, que es 1. Con estos datos, se puede afirmar que el inmunomodulador empleado induce un incremento en la concentración de IgG en las yeguas tratadas.

Figura 1. Histograma que muestra la media de la concentración de IgG entre las yeguas de los dos grupos.



Los resultados en el grupo de los potros fueron los siguientes:

IgM en potros del grupo control: 1,83 G/L
 IgM en potros del grupo experimental: 2,59

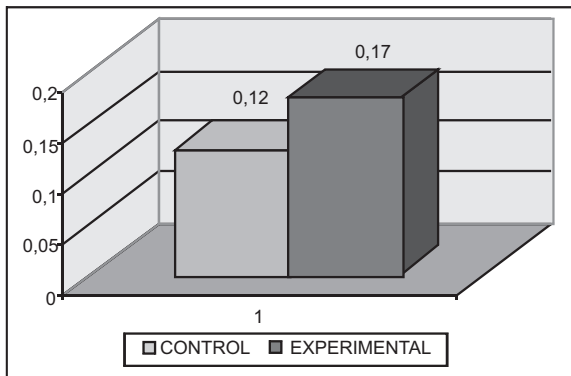
La diferencia, expresada en porcentaje, entre los dos grupos es la siguiente:

$$Xe - Xc \times 100: \frac{2,59 - 1,83}{1,83} \times 100 = 29,34\%$$

La diferencia de promedios entre el grupo control y el grupo experimental fue de $0,12 \pm 0,05$ y de $0,17 \pm 0,04$.

Al realizar la prueba t con los anteriores datos, el resultado del nivel de significancia fue de $P \leq 0,002$, lo que demostró que la diferencia en cuanto a la inmunestimulación del inmunomodulador para la producción de inmunoglobulina M en los potros fue medianamente significativa, ratificando su efecto sobre los animales tratados.

Figura 2. Histograma que muestra la media de concentración de IgM entre los dos grupos de potros.



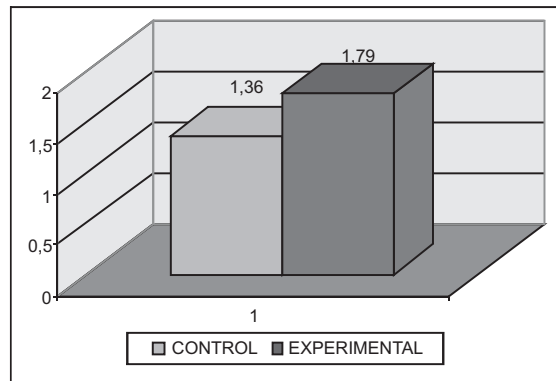
IgG en potros del grupo control: 20,35 G/L
 IgG en potros del grupo experimental: 26,94 G/L

$$Xe - Xc \times 100: \frac{26,94 - 20,35}{20,35} \times 100 = 24,46\%$$

Al realizar el análisis estadístico, la diferencia de promedios de concentración de IgG entre los dos grupos arrojó $1,36 \pm 0,40$ para el grupo control y $1,79 \pm 0,15$ para el grupo experimental.

La prueba t para el estudio de IgG en potros dio como resultado un nivel de significancia de 0,00034, demostrando un efecto altamente significativo en el estudio.

Figura 3. Histograma que muestra la media de las concentraciones de IgG entre los dos grupos de potros.



Los resultados demuestran una clara diferencia a favor de los grupos inmunestimulados en relación con la concentración de Igs tanto en yeguas como en potros.

Tal como se observó en estudios previos con otras especies, el producto inmunomodulador empleado estimuló la producción de Igs en las yeguas e incrementó la concentración de Igs en los potros. La mayor concentración de IgG en los potros se explica por el hecho de ser la que mejor

se transfiere desde el calostro; a su vez, la IgM, por su gran tamaño, podría presentar problemas de absorción por el intestino del neonato.

El efecto del inmunomodulador radica en sus dos componentes: el lipopolisacárido LPS y el *Propionibacterium granulosum*.

Aun cuando la acción del producto inmunomodulador no se encuentra completamente establecida, se sabe que los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) pueden actuar por vía inespecífica y específica, son activadores de linfocitos, son macrófagos e inducen la producción de TNF α . Se considera que el LPS es capaz de unirse a los receptores de los linfocitos y activarlos inespecíficamente, lo que conduce a blastogénesis y producción de células plasmáticas e inmunoglobulinas (Martínez, 2006).

Se espera que el estímulo en el sistema inmune de la madre genere la producción de Igs que se transfieran de manera pasiva al potro, mejorando con ello su resistencia a enfermedades de origen infeccioso.

El tratamiento con el producto inmunomodulador redujo la morbimortalidad a 0. Un resultado similar se había observado en trabajos previos con otras especies. Otras investigaciones realizadas en cerdas gestantes demostraron que la administración de este producto redujo la mortalidad de lechones predestete en un 20%, y las madres presentaron menor incidencia de metritis posparto. En cerdas preñadas que fueron vacunadas contra el virus de Aujeszky 21 días preparto se incrementó significativamente la concentración de IgA frente al virus.

En cuanto a la prueba del sulfato de zinc, la totalidad de las muestras resultaron positivas, es decir que en ninguno de los dos grupos se evidenció falla total o parcial en la transferencia de inmunidad pasiva, probando que en la finca no tenían problemas de una falla total en la transferencia de inmunidad pasiva. La prueba no pudo cuantificarse debido a la falta de espectrofotómetro.

Los pesos de los potros fueron evaluados durante ocho meses, en los cuales se evidenció una diferencia (ver tabla 1).

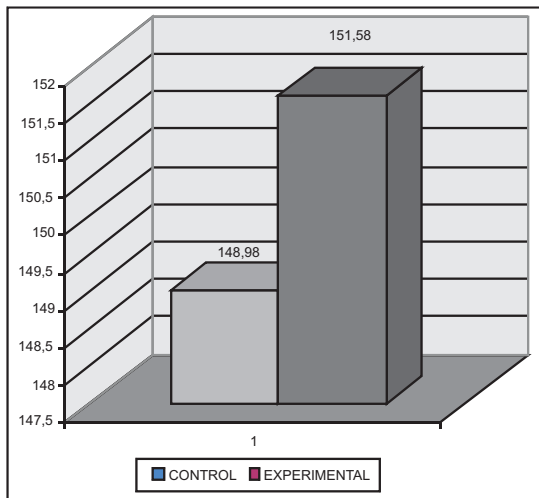
Tabla 1. Promedio de peso de los potros

Meses	promedio peso grupo control (kg)	promedios peso grupo experimental (kg)
0	36,9	37,8
1	61,8	62,9
2	98,5	100,1
3	114,1	118,2
4	148,3	150
5	174,9	178
6	203	207,3
7	234	239,7
8	268,2	272,3

La diferencia en los promedios de peso de los potros tratados y no tratados nos podría indicar que el producto inmunomodulador posee propiedades estimuladoras indirectas sobre el crecimiento fetal. Como se mencionó, el LPS puede actuar uniéndose inespecíficamente a receptores de linfocitos B y T y el CD 14 de macrófagos, con lo cual estas células se activan iniciando, en el caso de los linfocitos, un proceso de blastogénesis. Las células activadas secretan entonces una gama de citoquinas

con diversas actividades a distintos niveles orgánicos que podrían pasar a los fetos a través de la placenta, estimulando su crecimiento durante la última semana de gestación. De otro lado, aun cuando resulta menos probable dada la constitución placentaria, el LPS podría alcanzar la circulación fetal y estimular directamente receptores involucrados con el crecimiento.

Figura 4. Histograma que muestra los promedios de peso de los potros de los dos grupos.



CONCLUSIONES

- La aplicación de un inmunomodulador de la naturaleza, en las condiciones del producto utilizado en el presente estudio, incrementa la transferencia

pasiva de la inmunidad hacia los potros (Igs G y M).

- Se reitera que el consumo de calostro es fundamental en animales que, como los equinos, nacen agammaglobulinémicos. El consumo de calostro en cantidades adecuadas y en el período indicado garantiza menores índices de morbimortalidad. Sin embargo, es necesario cumplir estrictamente con las normas de bioseguridad, entre otras la higiene de las parideras, tranquilidad y reposo de los animales y desinfección de ombligos.
- En equinos, de la misma manera que sucede en bovinos y porcinos, la aplicación de LPS y *Propionibacterium granulosum*, durante la última semana de la gestación, estimula el crecimiento fetal, haciendo que los animales tratados tengan una mayor ganancia de peso.
- La aplicación de LPS y *Propionibacterium granulosum* a yeguas durante la última fase de la gestación, en las condiciones del presente estudio, logran disminuir los índices de morbilidad y mortalidad neonatal.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, R. *Efecto in vitro del compuesto IM-104 sobre determinados parámetros inmunológicos*. Valdeolmos: Laboratorios Calier S.A. Centro de Investigación en Sanidad Animal, 2000. p. 8.
- . *Análisis of the in vitro effects of compound inmodulen on several parameters of pig response*. Valdeolmos: Laboratorios Calier, les franqueses del Valles, Barcelona y Centro de Investigación en Sanidad Animal, 1997. p. 25.
- Benavides, A.; Almansa J.; Calderón, A.; Torres, O.; Delgado, N. y García, G. "Caracterización preliminar de la inmunidad pasiva natural en granjas porcícolas y evaluación de un sistema para incrementar la transferencia de anticuerpos". *Revista Nova de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca* (2006).
- Calier. *Manual de inmodulen*. Madrid: Laboratorios Calier, 1998. p.17.
- . *Manual de inmodulen*. Madrid: Laboratorios Calier, 1998. p. 30.
- Davies, M.E.; Horner, A.; Franz, B. & Schuberth, H.J. "Detection of cytokine activated chondrocytes in arthritic joints from pigs infected with *Erysipelotrix Rhusiopathiae*". *Ann rheum* 51 (1992): 978-982.
- Demmers, S.; Johannison, A.; Grondahl, G. & Jensen, M. *Neutrophil functions and serum IgG in growing foals*, 2001. Vol 33. n. 7. p. 676.
- Robinson, Edwuard. "Current therapy in equine medicine". *Elsevier science* (2003): 641-644, 677, 680, 692.
- Feldman, B.; Zinkl, G. & Jain, C. *Veterinary Hematology*. 5ed. Ed Lippincott Williams & Wilkins, 2000. pp. 904-905.
- Flaminio, J.; Lacombe, V.; Kohn, W. & Antezak, F. "Common variable immunodeficiency in a horse". *Journal Of The American Veterinary Medical Association*, v. 221, n. 1 (2002): 1296-1297.
- Gialdroni, C., McGuire, T. & Parrish, S.M. "Seasonal variation in passive transfer of immunoglobulin G1 to newborn calves". *Journal of American Veterinary Medical Association*, 183 (1993): 566-5468.
- González, F.A. & Roux, M.E. "Efectos del inmunomodulador IM-104 sobre la población linfocitaria de la mucosa intestinal de ratas inmunodeficientes". *Inmunologia*, 12 (1993): 59-63.
- Haddent J, J.W. "Inmunostimulants". *Immunol today*, 14 (1993): 275-280.
- Holznegel, D.L.; Hussey, S.; Mihalyi, J.E.; Wilson, W.D. & Lunn, D.P. "Onset of immunoglobulin production in foals". *Equine Veterinary Journal*, v. 35, n. 6. (2003): 620-621.

Http: www.produccionbovina.com

Jacobs, D.M. "Lipopolisaccharide and the immune response". En: Shober, W.; Hanson, I. & Sell K.Ñ. *Recent advance in mucosal immunology*. New York Flaven Press, 1982, pp. 47-55.

Kherli, M.E.& Toth, J.A. "Chemically induced immunomodulation in domestic food animals". *Adv vet sci Com Med.*, 35 (1990):103-119.

Kobuk Ames Gear. *The Horse Diseases & Clinical Management*. Saunders Company, 1995, pp. 275-278 1209,1221,1227. v. I y II.

Laboratorios Calier. *Monografía inmunocel.*

Lozada, V. *Evaluación del efecto de un inmunomodulador (inmunocel) en el control de la leucosis aviar en levante y producción en reproductoras pesadas*. Bogotá: Universidad de La Salle, 2000, p.68.

Martínez, H. y Quiroga, J. *Evaluación de la inmunidad pasiva en terneros recién nacidos de madres inmunestimuladas*. Bogotá: Universidad Antonio Nariño, 2004.

Martínez, C.E. "Modulación de la respuesta inmune: tendencias actuales". *Rev Cubana Invest Biomed*, 25, 4 (2006).

Megid, J.; Peracolli, M.T.S.; Curi, P.R.; Z. C.,R.; Cabrera, W.H.; Vassao, R. & Ito, F.H. "Effect of vaccination and the immunomodulators 'bacillus of Calmette-Guerin, Avridine and Propio-

nibacterium acnes' on rabies in mice. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases*, v. 21, n. 4 (1998): 306.

Megid, J.; Cremonini, D.N. & Leomil, H. "Distribution of rabies virus in infected mice, vaccinated and submitted to P. acnes as immunomodulator". *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases*, v.25, n. 4 (2002): 238.

Morilla, A. y Bautista, G. *Manual de inmunología veterinaria*. México: Ed Diana, 1986, 509 p.

Mulcahy, G. & Qinn, P.J. "A review of immunomodulators and their applications in veterinary medicine". *Vet Pharmacol Therapy*, 9 (1986): 119-139.

Muñoz, D. y Dávila, M. *Efecto del inmunocel sobre la producción de macrófagos en la médula ósea de caninos*. Bogotá: Universidad de La Salle, 2001, p. 83.

Norimatsu, M.; Ono, T.; Aoky, A.; Ohishi, K.; Watanabe, G.; Taya, K.; Sasamoto, S. & Tamura, Y. "Lipopolysaccharide induced apoptosis in swine lymphocytes in vivo". *Efect immu*, 63 (1995): 112-1126.

Ortiz, J.M.; Velazco, F.; Domínguez, J., Álvarez, B.; Marca, J. & Irrure, P. *Niveles de Ig A en el calostro de cerdas tratadas con inmodolen*. Resúmenes XVII Symposium Anaporc. Santiago de Compostella, España, 1996, 138 p.

- Pappaterra, G. "In vivo effect of inmodulen in Aujeszky vaccination". *Revista 16 Congress of the International Pig Veterinary Society*. Melbourne, Australia. (septiembre 17-20 de 2000): 56.
- Pell, E.; Noordhuizen, J.; Van Wuijnhuise, L. & Stassen, E. "Management factors related to calf morbidity and mortality rates". *Livestock production science*, 25 (1990): 79-93.
- Quinn, P.J. "Mechanisms of some immunomodulators used in veterinary medicine". *Adv Vet Sci Com Med*, 35 (1990): 43-99.
- Radostits, O.; Gay, C.; Blood, D. & Hinchcliff, K. *Veterinary Medicine*. 9th ed. Ed W.B Saunders, 2000, pp. 137-138.
- Roitt, I.; Blostott, J. & Male, D. *Inmunologia*. Ed harcourt. 5 ed., 1993. pp. 72-73.
- Roszkowski, W. & Szmigielski, S.. "Effect of three strains on propionibacteria (*P. Granulosum*, *P. Avidum*, *P. Acnes*) and cell wal preparation on lymphocytes and macrophages". *Zbl Bakt Hyg*, 246 (1980): 393-404.
- Scamurra, R.W.; Arriaga C.; Sprunger, L. & Baarsch, M.J. "Regulation of interleukin-6 expression in porcine immune cells". *J interferon Cytokine Res* 16 (1996): 289-296.
- Sellon, D. "Secondary Immunodeficiencies Of Horses". *The Veterinary Clinics Of North America*, v. 16, n. 1 (2000): 118-119.
- Sisquella, L. *Estudio de un inmunomodulador en aves*. Tesis para título de Doctor. Universidad de Barcelona, Departamento de Fisiología, Facultad de Biología, 2000.
- Stipkovits, L. "Efecto de la administración de inmodulen sobre la función reproductiva en cerdas". En: Congreso Internacional de Producción y Sanidad Animal Expoaviga. Carteles científicos XXI Symposium Anaporc. Barcelona, noviembre 7-10 de 2000, p. 318.
- Tizard, Ian. *Inmunología veterinaria*. . 6 ed. Ed Interamericana McGraw-Hill, 2000.
- Van Kampen, K.R. "Immunotherapy and cytokines". *Sem Vet Med Surg*, 12 (1997): 186-192.